

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID MALIGNANCIES

Клиническое значение иммунофенотипирования клеток костного мозга при множественной миеломе

Clinical Significance of Immunophenotyping of Bone Marrow Cells in Multiple Myeloma

О.Ю. Якимович, О.М. Вотякова, Н.В. Любимова, Н.Н. Тупицын

OYu Yakimovich, OM Votyakova, NV Lyubimova, NN Tupitsyn

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель. Анализ взаимосвязи между экспрессией aberrантных маркеров CD45, CD19 и CD56 на плазматических клетках и клинико-лабораторными и прогностически значимыми показателями у больных множественной миеломой (ММ).

Aim. To analyze the relationship between expression of aberrant CD45, CD19, CD56 markers on the plasma cells and clinical and laboratory findings and prognostically significant parameters in patients with multiple myeloma (MM).

Методы. В настоящее исследование включены данные клинического анализа и иммунофенотипирования клеток костного мозга 64 больных ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ с 2004 по 2015 г. Проточную трехцветную цитометрию проводили с использованием диагностической панели первично меченных флюорохромами моноклональных антител (CD38-PerCP, CD138-FITC) и конъюгированных с PE-моноклональными антителами к CD45, CD19 и CD56.

Methods. This scientific research includes data on clinical investigation and immunophenotyping of bone marrow cells obtained from 64 MM patients treated in the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center over the period from 2004 to 2015. The three-color flow cytometry was performed using a direct immunofluorescence technique (CD38-PerCP, CD138-FITC monoclonal antibodies) and PE-conjugated monoclonal antibodies against CD45, CD19, and CD56.

Результаты. При сравнении средних значений общего количества клеток плазмочитарного ряда, числа плазмобластов, проплазмочитов и зрелых плазматических клеток по данным миелограммы, а также сопоставлении этих данных с уровнем экспрессии маркера CD19 выявлены определенные закономерности. Отмечена статистически значимая взаимосвязь CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким уровнем как общего количества элементов плазмочитарного ряда, так и молодых форм плазматических клеток. Выявлена статистически значимая корреляция CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким уровнем С-реактивного белка — важного прогностического параметра при ММ. Кроме того, обнаружена взаимосвязь CD19-негативного фенотипа с более высоким числом (%) молодых форм нейтрофилов в крови, т. е. с более частым левым сдвигом в лейкоцитарной формуле. Для CD56-негативного фенотипа характерна плазмобластная морфология опухолевых клеток, а также наличие плазматических клеток в крови. Плазмочлеточный лейкоз чаще диагностируется у больных с CD56-негативным фенотипом опухолевых клеток. При CD45-негативном иммунофенотипе миеломных клеток в сравнении CD45-позитивным наблюдались более высокий уровень свободных легких цепей к-типа, протеинурия Бенс-Джонса, а также более высокий уровень креатинина в сыворотке.

Results. Comparison of average values of the total count of plasma cells, the number of plasmablasts, proplasmacyte and mature plasma cells (according to the myelogram) and comparison of these data with the level of expression of the CD19 marker demonstrated a significant relationship between the CD19 negative immunophenotype and both a higher level of the total count of plasma cells and immature plasma cells. There also was a significant correlation between the CD19 negative immunophenotype and a higher level of C-reactive protein, which is significant prognostic factor in MM. In addition, there was a significant relationship between the CD19 negative phenotype and a higher percentage of young neutrophils in blood, i.e. with a more frequent “left shift”. The CD56 negative phenotype is associated with plasmablastic morphology of plasma cells and with the presence of plasma cells in the peripheral blood. Plasma cell leukemia is more common in patients with CD56 negative phenotype of myeloma cells. The CD45 negative immunophenotype was associated with a higher level of k-type FLCs, Bence-Jones proteinuria and with a higher serum creatinine, than in the cases of CD45 positive phenotype.

Заключение. Исследование иммунофенотипа плазматических клеток при ММ имеет важное научно-практическое значение и требует дальнейшего изучения.

Conclusion. The study of the immunophenotype of plasma cells in MM has important scientific and practical significance and requires further study.

Ключевые слова: множественная миелома, aberrantный иммунофенотип плазматических клеток, маркеры CD45, CD19 и CD56, клинико-лабораторные показатели.

Keywords: multiple myeloma, aberrant immunophenotype of malignant plasma cells, CD45, CD19, and CD56 markers, clinical and laboratory parameters.

Получено: 17 марта 2016 г.

Принято в печать: 1 апреля 2016 г.

Received: March 17, 2016

Accepted: April 1, 2016

Для переписки: Оксана Юрьевна Якимович, аспирант, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)324-28-54; e-mail: ronc_ramn@mail.ru

Для цитирования: Якимович О.Ю., Вотякова О.М., Любимова Н.В., Тупицын Н.Н. Клиническое значение иммунофенотипирования клеток костного мозга при множественной миеломе. Клиническая онкогематология. 2016;9(3):296–301.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-296-301

For correspondence: Oksana Yur'evna Yakimovich, graduate student, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(499)324-28-54; e-mail: ronc_ramn@mail.ru

For citation: Yakimovich OYu, Votyakova OM, Lyubimova NV, Tupitsyn NN. Clinical Significance of Immunophenotyping of Bone Marrow Cells in Multiple Myeloma. Clinical oncohematology. 2016;9(3):296–301 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-296-301

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) — это злокачественная опухоль, представленная окончательно дифференцированными В-лимфоцитами, которые имеют структуру плазматических клеток или их ближайших предшественников (проплазмоцитов и плазмобластов) с многоочаговым (или диффузным) поражением костного мозга.

Для обнаружения субстрата болезни (моноклональных плазматических клеток) стандартными методами диагностики являются цитологическое исследование пунктата костного мозга, гистологическое исследование трепанобиоптата плоской кости и/или плазмоцитомы. Однако в связи с появлением высокоэффективных методов лечения ММ, внедрением в практику таргетных препаратов появилась необходимость более глубокого анализа структуры и свойств миеломных клеток. В этом плане представляет интерес aberrantный фенотип моноклональных плазматических клеток [1–13]. Наиболее достоверным и информативным методом определения aberrantного фенотипа является иммунофенотипирование клеток костного мозга методом проточной цитофлюориметрии. Научные и практические возможности этого метода диагностики при ММ можно подразделить на следующие направления:

1) возможность выявить и дать четкую характеристику миеломных клеток, даже если субстрат болезни минимален [7];

- 2) возможность выявления маркеров, имеющих значение для определения прогноза течения заболевания и ответа на противоопухолевую терапию [14, 15];
- 3) дифференциальная диагностика ММ, моноклональных гаммапатий неясного значения, лимфом и реактивных состояний [1, 16];
- 4) мониторинг минимальной остаточной болезни после проведения терапии [1–4, 10, 17];
- 5) создание новых таргетных препаратов, мишенями для которых могут служить aberrantные маркеры миеломных клеток [2, 18–21].

В литературных публикациях предложено большое число маркеров для обнаружения плазматических клеток. Обычно рекомендации включают определение CD38, CD138 и CD45 (наряду с характеристиками светорассеяния) в качестве каркасных маркеров для идентификации и количественной оценки плазматических клеток. Дополнительными маркерами могут служить CD19, CD56, CD117, CD20, CD28, CD27, CD81, CD200, CyIgκ, CyIgλ и β₂-микроглобулин. Нормальные и патологические плазматические клетки различаются по частоте экспрессии перечисленных антигенов (табл. 1).

Консорциумом «ЕвроФлоу» в 2012 г. разработана панель из 12 моноклональных антител в 8-цветной проточной цитометрии (2 пробы). Отобрано 4 каркасных маркера (CD38, CD138, CD45, CD19) для эффективного обнаружения плазматических клеток (CD38, CD138) и

Таблица 1. Экспрессия антигенов на плазматических клетках в норме и при множественной миеломе [10]

| Антиген | Экспрессия антигена на нормальных плазматических клетках | Уровень экспрессии антигена на нормальных плазматических клетках | Аберрантная экспрессия антигена | Частота случаев ММ с аберрантной экспрессией антигена |
|---------|--|--|---------------------------------|---|
| CD19 | + | > 70 % | – | 95 % |
| CD56 | – | < 15 % | + | 75 % |
| CD117 | – | 0 % | + | 30 % |
| CD20 | – | 0 % | + | 30 % |
| CD28 | –/слабая экспрессия | < 15 % | + | 15–45 % |
| CD27 | + | 100 % | –/слабая экспрессия | 40–50 % |
| CD81 | + | 100 % | –/слабая экспрессия | НД |
| CD200 | Слабая экспрессия | НД | + | НД |

«+» — экспрессия имеется; «–» — экспрессия отсутствует; НД — нет данных.

Таблица 2. Панель антител для диагностики плазмноклеточных опухолей «ЕвроФлоу» 2012

| РacBlue/ V450 | РacOr/ V500 | FITC | PE | PE-cy5 | PE-cy7 | APC | APC-H7 |
|------------------|----------------|------|------|----------|--------|-------|--------|
| CD45 | CD138 | CD38 | CD56 | B2-micro | CD19 | CyIgк | CyIgλ |
| CD45 | CD138 | CD38 | CD28 | CD27 | CD19 | CD117 | CD81 |

Таблица 4. Группы пациентов по количеству CD56-позитивных плазматических клеток

| Иммунофенотип ПК по уровню экспрессии CD56 | CD56-позитивные плазматические клетки, % | Число больных |
|--|--|---------------|
| Позитивный | 80–100 | 42 (65,6 %) |
| Позитивный на части ПК | 20–80 | 9 (14,1 %) |
| Негативный | 0–20 | 13 (20,3 %) |

ПК — плазматические клетки.

разграничения нормальных/реактивных и клональных плазматических клеток (CD19, CD38, CD45). Остальные 8 маркеров использовались для более подробной характеристики плазматических клеток. В предложенном иммунодиагностическом подходе дополнительные антитела равномерно разделены на две пробы: 1-я — CD56, β_2 -микроглобулин, CyIgк и CyIgλ; 2-я — CD27, CD28, CD81 и CD117. Пробы 1 достаточно для специфической идентификации, количественной оценки плазматических клеток и их разделения на нормальные/реактивные и патологические (с aberrantным иммунофенотипом). Проба 2 может использоваться по показаниям для более подробной характеристики плазматических клеток (табл. 2)[22].

Цель настоящей работы — анализ взаимосвязи между экспрессией aberrantных маркеров CD45, CD19 и CD56 на плазматических клетках и клинико-лабораторными и прогностически значимыми показателями у больных ММ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее исследование включены результаты клинического анализа и иммунофенотипирования клеток костного мозга 64 больных ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2004 по 2015 г.

Обследование пациентов проводилось согласно национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ММ 2014 г. [23].

Иммунофенотипирование клеток костного мозга у всех 64 больных выполнено в лаборатории иммунологии гемопоэза (руководитель — проф. Н.Н. Тупицын). Исследование проводили с использованием диагностической панели первично меченных флюорохромами моноклональных антител (Becton Dickinson, США): CD38-PerCP, CD138-FITC, а также конъюгированных с PE моноклональными антителами к CD45, CD19 и CD56. Проточная трехцветная цитометрия выполнена на приборах FACScan (Becton Dickinson, США) и EPIC XL-MCL (Becton Coulter, США). Анализ данных проводили на персональном компьютере с использованием программ WinMDI 2.8 и FCS3.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы SPSS Statistics, версия 21, на основе созданной базы данных. Оценка

Таблица 3. Группы пациентов по количеству CD19-негативных плазматических клеток

| Иммунофенотип ПК по уровню экспрессии CD19 | CD19-негативные плазматические клетки, % | Число пациентов |
|--|--|-----------------|
| Негативный | 80–100 | 54 (84,4 %) |
| Негативный на части ПК | 20–80 | 5 (7,8 %) |
| Позитивный | 0–20 | 4 (6,3 %) |

ПК — плазматические клетки.

Таблица 5. Группы пациентов по количеству CD45-негативных плазматических клеток

| Иммунофенотип ПК по уровню экспрессии CD45 | CD45-негативные плазматические клетки, % | Число больных |
|--|--|---------------|
| Негативный | 80–100 | 43 (67,2 %) |
| Негативный на части ПК | 20–80 | 12 (18,8 %) |
| Позитивный | 0–20 | 9 (14,1 %) |

ПК — плазматические клетки.

включала корреляционный анализ, анализ по таблицам сопряженности признаков с применением критерия χ^2 . Для определения статистической значимости различий в средних значениях количественных показателей использовался *t*-критерий Стьюдента. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее исследование включено 64 первичных больных ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2004 по 2015 г.

При иммунофенотипировании клеток костного мозга у 54 (84,4 %) из 64 больных количество CD19-негативных плазматических клеток составляло 80–100 %, т. е. практически полностью был утрачен этот маркер. У 5 (7,8 %) больных наблюдалась частичная утрата маркера CD19 (количество CD19-негативных плазматических клеток 20–80 %). У 4 (6,3 %) пациентов число CD19-негативных плазматических клеток составляло 0–20 %, т. е. определялся CD19-позитивный иммунофенотип плазматических клеток (табл. 3).

У 42 (65,6 %) больных диагностирован CD56-позитивный иммунофенотип плазматических клеток. У 9 (14,1 %) пациентов наблюдалась экспрессия маркера CD56 только на части клеток (20–80 %), а у 13 (20,3 %) количество CD56-позитивных плазматических клеток составило 0–20 %, т. е. определялся CD56-негативный иммунофенотип (табл. 4).

У 43 (67,2 %) больных диагностирован CD45-негативный иммунофенотип плазматических клеток. У 12 (18,8 %) пациентов наблюдалась частичная утрата маркера CD45 (количество CD45-негативных плазматических клеток 20–80 %), а у 9 (14,1 %) количество CD45-негативных плазматических клеток составляло 0–20 %, т. е. определялся CD45-позитивный иммунофенотип плазматических клеток (табл. 5).

При морфологическом исследовании пунктата костного мозга количество клеток плазмочитарного ряда составляло 8,4–94,1 %, в среднем — 41,02 % (медиана 35,8 %). При оценке морфологии клеток плазмочитарного ряда обращала на себя внимание группа пациентов с наличием плазмобластов ($n = 6$; 10,9 %). У 49 (89,1 %) пациентов элементы плазмочитарного ряда были пред-

ставлены только проплазмоцитами и плазматическими клетками. У ряда больных (25,9 %) отмечалось преобладание проплазмоцитов над плазматическими клетками. У этой группы пациентов уровень проплазмоцитов находился в диапазоне 10,6–71,4 %, среднее значение составило 36,9 %. По данным миелограммы число зрелых плазматических клеток в костном мозге было в диапазоне 1,6–86,4 %, среднее значение — 26 %.

В группе больных с CD19-положительным иммунофенотипом среднее количество клеток плазмочитарного ряда по данным миелограммы составило $13,15 \pm 2,41$ % ($n = 4$). У пациентов с уровнем CD19-негативных плазматических клеток 20–100 % среднее количество клеток плазмочитарного ряда составило $43,03 \pm 3,19$ % ($n = 59$), различия статистически значимы ($p = 0,000$). В группе больных с 0–80 % CD19-негативных плазматических клеток среднее число элементов плазмочитарного ряда по данным миелограммы было $15,15 \pm 3,26$ % ($n = 10$). При CD19-негативном иммунофенотипе среднее количество клеток плазмочитарного ряда составило $46,03 \pm 3,25$ % ($n = 53$) ($p = 0,000$). Таким образом, при сравнении средних значений количества элементов плазмочитарного ряда по данным миелограммы и сопоставления этих результатов с уровнем экспрессии маркера CD19 на плазматических клетках выявлена статистически значимая взаимосвязь CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким числом миеломных клеток. Чем ниже уровень CD19-положительных плазмоцитов, тем больше число клеток (%) плазмочитарного ряда в костном мозге, а следовательно, тем больше объем и распространенность опухоли.

У 4 больных с CD19-положительным иммунофенотипом плазмобласты в миелограмме не встречались. У пациентов с уровнем CD19-негативных плазматических клеток 20–100 % среднее количество плазмобластов составило $0,35 \pm 0,16$ % ($n = 50$). При числе CD19-негативных плазматических клеток 0–80 % плазмобласты в костном мозге (миелограмме) практически отсутствовали ($n = 9$). При CD19-негативном фенотипе среднее количество плазмобластов было $0,39 \pm 0,18$ % ($n = 45$) ($p = 0,034$).

Таким образом, по результатам статистического анализа можно сделать вывод о том, что CD19-негативный иммунофенотип плазматических клеток связан с наличием плазмобластов среди элементов плазмочитарного ряда в отличие от CD19-положительного иммунофенотипа, при котором плазмобластная морфология плазматических клеток вообще не встречалась.

У больных с CD19-положительным иммунофенотипом среднее число проплазмоцитов по данным миелограммы составило $0,3 \pm 0,3$ % ($n = 4$), у больных с 20–100 % CD19-негативных плазматических клеток среднее количество проплазмоцитов было $14,46 \pm 2,7$ % ($n = 49$) ($p = 0,000$). У больных с уровнем CD19-негативных плазматических клеток 0–80 % среднее количество проплазмоцитов по данным миелограммы составило $1,22 \pm 0,64$ % ($n = 9$), а у пациентов с CD19-негативным фенотипом — $15,88 \pm 2,93$ % ($n = 44$) ($p = 0,029$). Таким образом, CD19-негативный иммунофенотип плазматических клеток коррелирует с наличием проплазмоцитов среди элементов плазмочитарного ряда в отличие от CD19-положительного иммунофенотипа. При CD19-положительном фенотипе миеломных клеток проплазмоциты практически отсутствуют.

При CD19-положительном иммунофенотипе среднее количество зрелых плазматических клеток по данным

миелограммы составило $12,85 \pm 2,5$ % ($n = 4$), а у больных с CD19-негативным — 20–100 % со средним количеством $27,18 \pm 3,17$ % ($n = 49$) ($p = 0,002$). У пациентов с 0–80 % CD19-негативных плазматических клеток среднее их количество по данным миелограммы равнялось $13,89 \pm 3,14$ % ($n = 9$). При CD19-негативном иммунофенотипе среднее число плазматических клеток составило $28,6 \pm 3,42$ % ($n = 44$) ($p = 0,003$). Таким образом, выявлена статистически значимая взаимосвязь CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким числом плазматических клеток со зрелой морфологией.

По данным ряда исследований, основным фактором роста миеломных клеток является интерлейкин-6 (ИЛ-6). В клинической практике об активности ИЛ-6 судят по уровню С-реактивного белка (СРБ). ИЛ-6 индуцирует синтез СРБ гепатоцитами. Повышение уровня СРБ в сыворотке служит неблагоприятным прогностическим фактором. В нашем исследовании уровень СРБ, превышающий нормальные значения (> 6 мг/л), выявлен у 18 (32,7 %) больных. Нормальные показатели СРБ наблюдались у 37 (67,3 %) пациентов. При оценке сопряженности повышения уровня СРБ в сыворотке выше нормы у больных ММ и уровнем экспрессии CD19 на опухолевых клетках выявлена взаимосвязь между этими двумя показателями. У всех 18 больных с уровнем СРБ, превышающим нормальные значения (> 6 мг/л), отмечалась полностью отрицательная по CD19 популяция плазматических клеток. Случаи с отсутствием CD19 на части клеток и положительные по экспрессии CD19 наблюдения отсутствовали (0 %). У больных с нормальным уровнем СРБ (< 6 мг/л) соответствующие показатели составили 72,2, 16,7 и 11,1 %. Признаки взаимосвязаны: $\chi^2 = 6,136$; $p = 0,047$. Выявлена статистически значимая корреляция CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким уровнем СРБ. У больных с CD19-положительным иммунофенотипом среднее значение СРБ в сыворотке составило $2,32 \pm 0,63$ мг/л ($n = 4$), а у больных с 20–100 % CD19-негативных плазматических клеток — $9,38 \pm 2,32$ мг/л ($n = 50$) ($p = 0,005$). У пациентов с количеством CD19-негативных плазматических клеток 0–80 % среднее значение СРБ в сыворотке было $1,85 \pm 0,35$ мг/л ($n = 10$), а у пациентов с CD19-негативным фенотипом — $10,45 \pm 2,6$ мг/л ($n = 44$) ($p = 0,002$). Выявлена статистически значимая связь CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким уровнем СРБ, являющимся важным прогностическим фактором при ММ. Таким образом, чем больше выражена утрата маркера CD19 на плазматических клетках, тем выше уровень СРБ.

У 14 (23 %) пациентов в крови наблюдался лейкоцитоз и/или сдвиг лейкоцитарной формулы влево (сегментоядерные нейтрофилы > 72 %, палочкоядерные нейтрофилы > 6 %, метамиелоциты > 1 %), что требовало исключения инфекции. У больных с CD19-положительным иммунофенотипом средняя доля палочкоядерных нейтрофилов среди общего числа лейкоцитов была $1,8 \pm 0,6$ % ($n = 4$), а у пациентов с числом CD19-негативных плазматических клеток 20–100 % — $5,3 \pm 1,2$ % ($n = 43$) ($p = 0,013$). У больных с CD19-положительным иммунофенотипом ($n = 4$) метамиелоциты в крови отсутствовали, а у больных с уровнем CD19-негативных плазматических клеток 20–100 % среднее значение относительного числа метамиелоцитов составило $0,4 \pm 1,2$ % ($n = 43$).

($p = 0,017$). У больных с 0–80 % CD19-негативных плазматических клеток метамиелоциты не обнаруживались ($n = 9$), а у больных с CD19-негативным фенотипом плазматических клеток относительное число метамиелоцитов составило в среднем $0,5 \pm 0,2$ % ($n = 38$) ($p = 0,016$). У больных с CD19-позитивным иммунофенотипом миелоциты в крови отсутствовали ($n = 4$), у больных с уровнем CD19-негативных плазматических клеток 20–100 % относительное число миелоцитов составило в среднем $0,4 \pm 0,1$ % ($n = 43$) ($p = 0,008$). Таким образом, выявлена статистически значимая связь CD19-негативного иммунофенотипа с более высоким относительным содержанием молодых форм нейтрофилов, т. е. с более частым сдвигом лейкоцитарной формулы влево. Вероятнее всего, этим объясняются более частые и тяжелые инфекционные осложнения у больных с CD19-негативным фенотипом миеломных клеток.

Выявлена взаимосвязь между двумя показателями: присутствие плазмобластов в миелограмме и уровень экспрессии CD56 на опухолевых клетках. Полностью положительная по экспрессии CD56 популяция опухолевых клеток наблюдалась у 2 из 6 больных с наличием плазмобластов в миелограмме. Случаи с отсутствием CD56 на части клеток не встречались, а отрицательные по экспрессии CD56 наблюдения имели место у 4 из 6 больных. При отсутствии плазмобластов в миелограмме соответствующие показатели составили 67,3, 18,4 и 14,3 %. Признаки взаимосвязаны: $\chi^2 = 9,407$; $p = 0,009$. Таким образом, морфологический вариант клеток плазмочитарного ряда коррелирует с уровнем экспрессии аберрантного маркера CD56. Для CD56-негативного иммунофенотипа характерна плазмобластная морфология клеток плазмочитарного ряда в костном мозге.

У 4 (8 %) больных в лейкоцитарной формуле были выявлены плазматические клетки. У 2 пациентов плазматические клетки в крови составили 1 и 2 % соответственно. У 2 других больных этот показатель был более 20 % (34,8 и 70,0 % соответственно), что позволило подтвердить наличие плазмочелочного лейкоза. Плазмочелочный лейкоз устанавливается при количестве плазматических клеток более 20 % в лейкоцитарной формуле или при абсолютном числе плазматических клеток более 2×10^9 /л [24]. У больных с CD56-негативным иммунофенотипом среднее значение плазматических клеток в крови было $9,5 \pm 6,8$ % ($n = 11$), а у пациентов с 20–100 % CD56-позитивных плазматических клеток — $0,1 \pm 0,1$ % ($n = 38$) ($p = 0,011$). Также стоит отметить 2 наблюдения с количеством плазматических клеток в крови 34,8 и 70 %, относящиеся к острому плазмочелочному лейкозу, варианту ММ. В обоих случаях наблюдался CD56-негативный фенотип плазматических клеток. Таким образом, выявлена взаимосвязь CD56-негативного иммунофенотипа с большим числом плазматических клеток в крови, позволившим установить плазмочелочный лейкоз.

Согласно рекомендациям, разработанным Международной рабочей группой по изучению ММ (International Myeloma Working Group), нормальная концентрация свободных легких цепей (СЛЦ) κ -типа составляет 3,3–19,4 мг/л [23, 25]. В настоящей работе исследование СЛЦ было проведено у 33 пациентов. Секрета СЛЦ κ -типа наблюдалась у 19 (58,8 %) больных, λ -типа — у 13 (38,2 %). У 1 (2,9 %) больного был несекретирующий тип ММ. У больных с κ -типом ММ значения κ -СЛЦ

колебались от 24,1 до 23 040 мг/л (медиана 254,95 мг/л). При κ -типе ММ в группе с CD45-позитивным иммунофенотипом уровень СЛЦ κ -типа был $30,6 \pm 13,7$ мг/л ($n = 2$), а у больных с 20–100 % CD45-негативных плазматических клеток среднее значение СЛЦ κ -типа составило $2954,7 \pm 1394,9$ мг/л ($n = 17$) ($p = 0,052$). Таким образом, CD45-негативный иммунофенотип плазматических клеток связан с более высоким уровнем СЛЦ κ -типа, чем CD45-позитивный.

Белок Бенс-Джонса в моче на этапе первичной диагностики ММ выявлен у 35 из 60 больных и находился в диапазоне 0,01–12,3 г/сут. Среднее значение составило 2,14 г/сут, медиана — 0,92 г/сут. У больных с CD45-позитивным иммунофенотипом среднее суточное количество белка Бенс-Джонса в моче, определенное методом иммунофиксации, было $0,084 \pm 0,056$ г ($n = 9$); у больных с 20–100 % CD45-негативных плазматических клеток уровень белка Бенс-Джонса был в среднем $1,41 \pm 0,357$ г/сут ($n = 51$) ($p = 0,001$). Таким образом, CD45-негативный иммунофенотип плазматических клеток коррелирует с протеинурией Бенс-Джонса.

Согласно рекомендациям Международной рабочей группы 2014 г., почечная недостаточность подтверждается при повышении уровня креатинина сыворотки до 177 мкмоль/л и более или при снижении клиренса креатинина менее 40 мл/мин [3]. В нашем исследовании почечная недостаточность констатирована у 14 (21,9 %) больных ММ. У 50 (78,1 %) пациентов на этапе первичной диагностики ММ почечной недостаточности не было. У больных с почечной недостаточностью уровень креатинина был повышен в диапазоне 194–926 мкмоль/л, среднее значение составило 478,14 мкмоль/л. У больных с CD45-позитивным иммунофенотипом уровень креатинина в сыворотке был в среднем $97,4 \pm 16,5$ мкмоль/л ($n = 9$), а у пациентов с количеством CD45-негативных плазматических клеток 20–100 % — $184,9 \pm 28,6$ мкмоль/л ($n = 54$) ($p = 0,011$). Таким образом, отчетливо обнаруживается взаимосвязь CD45-негативного иммунофенотипа с более высоким уровнем креатинина, т. е. с почечной недостаточностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что аберрантность иммунофенотипа клеток ММ находит отражение в клиническом течении опухоли. У больных с отсутствием CD45 на злокачественных клетках наблюдается более высокий уровень СЛЦ в сыворотке, протеинурия Бенс-Джонса и повышение креатинина в сравнении со случаями с «нормальным» по CD45 иммунофенотипом. Аберрантность по CD19 отражается на более высокой концентрации СРБ в крови больных ММ. Выявлена статистически значимая связь уровня экспрессии маркеров CD19 и CD56 с морфологическими особенностями элементов плазмочитарного ряда в костном мозге и наличием плазматических клеток в крови больных.

Изучение аберрантности иммунофенотипа злокачественных клеток ММ по трем ключевым маркерам (CD19, CD45, CD56) не только имеет значение для контроля эффективности лечения на основе определения остаточной болезни, но и взаимосвязано с клиническими особенностями заболевания при диагностике.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Н.Н. Тупицын, заместитель главного редактора журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовал в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: О.Ю. Якимович.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: О.Ю. Якимович, О.М. Вотякова, Н.Н. Тупицын.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Куртова А.В. Диагностика множественной миеломы и мониторинг эффективности терапии. Иммунология гемопоеза. 2008;5(2):44–56.

[Zueva EE, Rusanova EB, Kurtova AV. Diagnosis of multiple myeloma and treatment efficacy monitoring. *Immunologiya gemopoeza*. 2008;5(2):44–56. (In Russ)]

2. Bataille R, Jero G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006;91(9):1234–40.

3. de Tute RM, Jack AS, Child JA, et al. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia*. 2007;21(9):2046–9. doi: 10.1038/sj.leu.2404815.

4. Johnsen HE, Bogsted M, Klausen TW, et al. Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78B(5):338–47. doi: 10.1002/cyto.b.20523.

5. Manzanera GM, San Miguel I, Izquierdo JF, de Matos OA. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Meth Mol Med*. 2005;113:5–24. doi: 10.1385/1-59259-916-8:5.

6. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(10):3661–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1489.

7. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1655–65.

8. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smouldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110(7):2586–92. doi: 10.1182/blood-2007-05-088443.

9. Rawstron AC, Davies FE, Das Gupta R, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic

plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002;100(9):3095–100. doi: 10.1182/blood-2001-12-0297.

10. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93(3):431–8. doi: 10.3324/haematol.11080.

11. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*. 2005;105(12):4845–8. doi: 10.1182/blood-2004-12-4700.

12. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: A tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002;99(5):1853–6. doi: 10.1182/blood.v99.5.1853.

13. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001;86(8):837–43.

14. Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*. 2004;89(5):547–51.

15. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, et al. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia*. 1998;12(12):1977–82. doi: 10.1038/sj.leu.2401211.

16. Jego G, Avet-Loiseau H, Robillard N, et al. Reactive plasmacytoses in multiple myeloma during hematopoietic recovery with G- or GM-CSF. *Leuk Res*. 2000;24(7):627–30. doi: 10.1016/s0145-2126(00)00033-3.

17. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90(10):1365–72.

18. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, et al. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood*. 2002;99(6):2172–8. doi: 10.1182/blood.v99.6.2172.

19. Robillard N, Wuilleme S, Lode L, et al. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target. *Leukemia*. 2005;19(11):2021–2. doi: 10.1038/sj.leu.2403948.

20. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4- DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;104(12):3688–96. doi: 10.1182/blood-2004-03-0963.

21. Treon SP, Raje N, Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Semin Oncol*. 2000;27(5):598–613.

22. Тупицын Н.Н. Иммунология клеток крови. В кн.: Гематология. Национальное руководство. Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. С. 70–8.

[Tupitsyn NN. Blood cell immunology. In: Rukavitsyn OA, ed. *Gematologiya. Natsional'noe rukovodstvo*. (Hematology. National guidelines.) Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2015. pp. 70–8. (In Russ)]

23. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. Гематология и трансфузиология. 2014;59(приложение 3):1–37. [Mendeleeva LP, Votyakova OM, Pokrovskaya OS, et al. National clinical guidelines for diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014;59(Suppl. 3):1–37. (In Russ)]

24. Lin P. Плазмноклеточная миелома. Прогресс в лечении множественной миеломы. *Best Clin Pract*, русское издание. 2009;2:11–6. [Lin P. Plasma cell myeloma. Progress in treatment of multiple myeloma. *Best Clin Pract*, Russian edition. 2009;2:11–6 (In Russ)]

25. Вотякова О.М., Любимова Н.В., Турко Т.А. и др. Клиническое значение исследования свободных легких цепей иммуноглобулинов при множественной миеломе. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2010;5(4):16–20.

[Votyakova OM, Lyubimova NV, Turko TA, et al. Clinical implication of immunoglobulin free light chains study in patients with multiple myeloma. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN*. 2010;5(4):16–20. (In Russ)]